柞蚕蛹滞育和滞育解除过程中海藻糖酶基因表达模式及酶活力分析

王德意[1], 汝玉涛[1], 王 勇[1,*], 马月月[1], 那 爽[1], 孙良振[2], 姜义仁[1], 秦 利[1,*]

(1. 沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁省昆虫资源工程技术研究中心, 沈阳 110866;
2. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要:【目的】克隆柞蚕 *Antheraea pernyi* 海藻糖酶(trehalase, Treh)基因,探讨该基因在柞蚕蛹滞育和滞育解除过程中的表达模式与海藻糖酶活力变化,为阐明柞蚕蛹滞育期间糖代谢机制提供参考。【方法】利用 RT-PCR 技术从柞蚕蛹中克隆获得海藻糖酶基因,并对其进行生物信息学分析。采用半定量 RT-PCR 检测长光照(17L:7D)处理后的滞育解除柞蚕蛹与对照滞育蛹不同组织中该基因的表达谱;采用实时定量 PCR(qPCR)分析其在长光照下滞育解除过程中柞蚕蛹脂肪体中的相对表达量变化。利用 3,5-二硝基水杨酸法检测脂肪体中海藻糖酶活力的变化,同时采用蒽酮比色法测定其血淋巴中海藻糖含量。【结果】克隆获得柞蚕 3 个海藻糖酶基因,分别命名为 *ApTreh1A*, *ApTreh1B* 和 *ApTreh2*(GenBank 登录号分别为: KU977455, KU977456 和 KU977457),开放阅读框(ORF)全长分别为 1 797, 1 635 和 1 932 bp,分别编码 598, 544 和 643 个氨基酸。同源序列比对与系统进化树分析表明,ApTreh1A 和 ApTreh1B 为可溶型海藻糖酶(TrehS),ApTreh2 为膜结合型海藻糖酶(TrehM)。半定量 RT-PCR 检测发现,各组织中 *ApTreh2* 比 *ApTreh1* 的分布更广且表达量更高。qPCR 检测发现,*ApTreh1A* 和 *ApTreh1B* 在长光照处理后的柞蚕蛹脂肪体中,21 d 时表达量都表现出快速升高[分别是对照组(12L:12D)的 2 倍和 4.7 倍],28 d 与 35 d 时下降,42 d 时表达量再次升高;*ApTreh2* 随着滞育的解除表达量逐渐升高,28 d 时达到最高(约为对照组的 2.7 倍),42 d 时又出现一个小高峰(约 2.3 倍),后期逐渐下降。长光照下脂肪体中海藻糖酶活力逐渐升高,21 d 时达到最高(约 18.5 U),35 d 时降到最低(约 11.2 U),42 d 时其酶活力再次略微升高,之后呈下降趋势,与基因表达变化趋势一致。蛹血淋巴中海藻糖含量在长光照条件下呈现出升高趋势,21 d 时达到最高,在整个发育时期的含量比对照组要高。【结论】本研究结果表明柞蚕蛹滞育解除过程中海藻糖酶基因表达的变化与蛹脂肪体中海藻糖酶活性、蛹血淋巴中海藻糖含量的变化趋势呈一致性,提示海藻糖酶基因的表达响应在柞蚕蛹滞育解除中发挥重要作用。

关键词: 柞蚕; 滞育; 海藻糖酶; 海藻糖; 基因表达; 酶活力

中图分类号: Q966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0454-6296(2018)07-0784-11

Gene expression patterns and activities of trehalases in *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) pupae during diapause and diapause termination

WANG De-Yi[1], RU Yu-Tao[1], WANG Yong[1,*], MA Yue-Yue[1], NA Shuang[1], SUN Liang-Zhen[2], JIANG Yi-Ren[1], QIN Li[1,*] (1. Liaoning Engineering and Technology Research Center for Insect Resource,

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-18); 辽宁省教育厅一般项目(L2015488)

作者简介: 王德意, 男, 1993 年 3 月生, 安徽宿州人, 硕士研究生, 研究方向为昆虫生理学, E-mail: deyiwang0316@163.com

* 通讯作者 Corresponding authors, E-mail: yongwang216@163.com; qinli1963@163.com

收稿日期 Received: 2018-01-16; 接受日期 Accepted: 2018-03-28

College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;
2. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract:【Aim】Gene expression patterns and enzyme activities of trehalases in *Antheraea pernyi* pupae during diapause and diapause termination were detected so as to elucidate the relationship between carbohydrate metabolism and diapause termination during diapause of this insect.【Methods】The trehalase genes were cloned from *A. pernyi* pupa using RT-PCR technology and subjected to bioinformatics analysis. Their expression patterns in different tissues of *A. pernyi* pupae during diapause termination after exposure to long photoperiod (17L∶7D) and diapause (the control group) were analyzed by semi-quantitative RT-PCR. The relative expression levels of trehalase genes in the fat body of *A. pernyi* pupae during diapause termination under long photoperiod were measured using qPCR, the trehalase activity in the fat body was detected using 3,5-dinitrosalicylic acid method and the trehalose content in the haemolymph was measured using antrone chromametry method.【Results】Three trehalase genes were cloned from *A. pernyi*, named *ApTreh1A*, *ApTreh1B* and *ApTreh2* and deposited in GenBank under accession numbers KU977455, KU977456 and KU977457, respectively. Their open reading frames (ORFs) are 1 797, 1 635 and 1 932 bp in length, encoding 598, 544 and 643 amino acids, respectively. Homologous sequence alignment and phylogenetic analysis indicated that ApTreh1A and ApTreh1B are soluble trehalases (TrehS), and ApTreh2 is a membrane-bound trehalase (TrehM). Tissue-specific mRNA expression profiling using semi-quantitative RT-PCR showed that *ApTreh2* had a wider distribution and higher expression level than *ApTreh1*. The qPCR results indicated that the expression levels of *ApTreh1A* and *ApTreh1B* in fat body at 21 d after exposure to long photoperiod were up-regulated and significantly higher than that of the control group (12L∶12D) (2- and 4.7-fold, respectively), while down-regulated at 28 and 35 d, and then up-regulated again at 42 d. The expression levels of *ApTreh2* were up-regulated gradually, and reached the maximum (2.7-fold as high as that of the control group) at 28 d. At 42 d after exposure to long photoperiod, there was another expression peak (2.3-fold as high as that of the control group), and then down-regulated gradually. Trehalase activities in fat body increased gradually, reached the peak (about 18.5 U) at 21 d after exposure to long photoperiod, while declined to the lowest level (11.2 U) at 35 d, and increased slightly at 42 d, showing the same variation trend as the gene expression. The trehalose content in the haemolymph increased under long photoperiod and reached the maximum at 21 d, and was higher than that of the control during the whole developmental stage.【Conclusion】The results suggest that the expression of trehalase genes shows the same variation trend as the trehalase activities in the fat body and the trehalose content in the haemolymph in *A. pernyi*, suggesting that the expression response of trehalase genes plays a significant role in pupal diapause and diapause termination of *A. pernyi*.

Key words: *Antheraea pernyi*; diapause; trehalase; trehalose; gene expression; enzyme activity

滞育(diapause)是昆虫重要的生理状态,主要表现为生长发育的停滞和生理活动的降低,使得昆虫在不良环境中得以生存和延续(徐卫华, 1992)。昆虫进入滞育前,会通过不同的代谢途径将部分能量储存起来,以糖原的形式进行积累,不同昆虫会在滞育前期或滞育期将糖原转化为葡萄糖、海藻糖、甘油、山梨醇等小分子物质(丁惠梅等, 2011)。这些物质对昆虫的抗寒性、抗干旱性及耐高温性等起着重要作用(王满囷和李周直, 2004)。

海藻糖(trehalose)作为昆虫的血糖,其含量及海藻糖酶(trehalase, Treh)活力变化与昆虫滞育、滞育的解除和发育密切相关(仵均祥等, 2004)。过去人们认为滞育激素直接诱导了滞育,但更多的研究表明,海藻糖在两者之间发挥重要作用。如家蚕 *Bombyx mori* 在进入滞育前,滞育激素通过调控海藻糖酶的活性,促使海藻糖被分解成葡萄糖进入卵细胞转化为糖原诱导卵滞育(Yamashita, 1996)。在昆虫体内,海藻糖主要是由脂肪体合成并分泌到血

淋巴,被其他的组织吸收后被利用(Bounias *et al.*, 1993)。海藻糖酶由海藻糖酶基因编码调控,以可溶型海藻糖酶(soluble trehalase, Treh1 或 TrehS)和膜结合型海藻糖酶(membrane-bound trehalase, Treh2 或 TrehM)的形式存在于昆虫组织中,其中可溶型海藻糖酶存在于细胞质中,用于分解细胞内的海藻糖,而膜结合型海藻糖酶存在于细胞膜上,属于跨膜蛋白,用于水解食物中的海藻糖(唐斌等, 2012)。昆虫体内最先鉴定出的海藻糖酶基因是可溶型海藻糖酶 Treh1(Takiguchi *et al.*, 1992),直到 2005 年,才有膜结合型海藻糖酶 Treh2 的报道(Mitsumasu *et al.*, 2005)。干扰这些基因会影响昆虫的生长发育,表明 Treh 在糖代谢通路中发挥重要作用,参与昆虫重要的生理过程(Chen *et al.*, 2010; 张倩等, 2012; Zhao *et al.*, 2016)。

柞蚕 *Antheraea pernyi* 是一种取食柞树叶的鳞翅目泌丝昆虫,是我国一种重要的经济昆虫,需经历卵、幼虫、蛹和成虫 4 个阶段。由于地理纬度的不同,光照时间影响了柞蚕的化性。一化性柞蚕或二化性秋柞蚕会经过蛹滞育期,等到来年羽化成蛾(秦利和李树英, 2017)。光周期是影响柞蚕滞育的主要因素,通过柞蚕脑分泌的促前胸腺激素(PTTH)作用于前胸腺并合成蜕皮激素来调控柞蚕的变态发育(Sauman and Reppert, 1996)。我们在前期的研究中也发现,PTTH 及蜕皮激素受体(ecdysone receptor, EcR)基因与超气门结合蛋白(ultraspiracle, USP)基因组成的异源二聚体在柞蚕蛹解除滞育及发育的过程中发生了明显的变化(李慧君, 2016; 汝玉涛等, 2017)。海藻糖作为血糖,与脂肪体中的糖原存在"镜像关系",且受到温度的影响(陆明贤和杨长松, 1992)。海藻糖的动态变化分别受到海藻糖合成酶(trehalose-6-phosphate synthase, TPS)和海藻糖酶的影响。海藻糖不仅能够提供生命活动所需的能量,同时也在抗寒性中有着重要作用(Thompson, 2003)。柞蚕 TPS 基因表达量在长光照(17L∶7D)处理 30 d 的柞蚕滞育蛹脂肪体中达到最高,在 40 d 的血淋巴中达到最大值且变化相对平缓(黄伶等, 2016)。TPS 的表达和酶活力的变化影响了柞蚕蛹体内海藻糖合成的速率,而唯一分解并利用海藻糖的海藻糖酶在柞蚕蛹解除滞育过程中是如何变化、且对海藻糖的含量有何影响也亟待探讨。本研究从柞蚕体内筛选到了 3 个海藻糖酶基因,通过序列分析和系统进化树构建,确定其为可溶型和膜结合型 2 种不同类型;并检测长光照解除滞育过程中柞蚕桶中海藻糖酶基因表达、酶活力变化与海藻糖含量的关系,为柞蚕滞育期糖代谢机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试虫来源与处理

一化性柞蚕"豫大 1 号"由河南蚕业研究所提供,分别选取结茧 30 d 后自然进入滞育期柞蚕蛹和光周期 17L∶7D、光照强度 4 000 lx、温度 22℃ 条件下解除滞育后发育期(光照处理 35 d 后)的柞蚕蛹,冰浴解剖,取脑、脂肪体、中肠、血淋巴、精/卵巢、表皮等组织,3 头蛹的组织样品混合取样,3 个生物学重复,-80℃ 冰箱保存,用于目的基因的组织表达检测。

取"豫大 1 号"滞育期柞蚕蛹,参照邓华山(1980)的方法,以光周期 17L∶7D、光照强度 4 000 lx、温度 22℃ 的光照培养箱中处理为试验组,以光周期 12L∶12D、光照强度 4 000 lx、温度 22℃ 的光照培养箱中处理为对照组,每 7 d 取脂肪体和血淋巴组织,单头为一组,3 个重复,直至羽化,-80℃ 冰箱保存备用,分别用于海藻糖酶活力、基因表达和海藻糖含量测定。

1.2 主要试剂

总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus、PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser、SYBR Premix Ex Taq™ 等购自大连宝生物,EasyTaq DNA 聚合酶、胶回收试剂盒购自康为世纪,海藻糖含量及其酶活力测定试剂盒购自苏州科铭生物技术有限公司,其他试剂均为国产分析纯,引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。

1.3 RNA 的提取及海藻糖酶基因克隆

总 RNA 的提取参照 RNAiso Plus 说明书进行,用 NanoDrop 2000 微量分光光度计(Thermo 公司)测定 RNA 纯度及浓度。按照 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书合成 cDNA 用于 PCR 和组织半定量检测。实时定量(qPCR)分析采用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒进行 cDNA 第 1 链的合成。

依据本实验室建立的柞蚕中肠转录组数据(Li *et al.*, 2016),筛选注释为柞蚕海藻糖酶的 Unigene 序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(表 1)。PCR 反应体系(50 μL): cDNA 模板(1 μg/μL)

2 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 2 μL，EasyTaq DNA 聚合酶（5 U/μL）25 μL，补充水至总体系 50 μL。PCR 扩增程序：95℃ 预变性 3 min；95℃ 30 s，55℃ 30 s，72℃ 1 min，循环 34 次；72℃ 延伸 5 min。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶泳检测，扩增产物经快速凝胶回收试剂盒回收后连接 pMD18-T 载体并转化大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5α，阳性克隆菌落 PCR 验证无误后送上海生工测序。

表 1　引物信息

Table 1　Primer information

引物 Primers	引物序列（5′－3′） Primer sequences	引物用途 Use of primers
Treh1A-F	ATCTTCAAGCCAGTTTCATACG	*Treh1A* 片段扩增
Treh1A-R	TAACCTATTCCTTATGTAGCCAGAC	Amplification of *Treh1A* fragment
Treh1B-F	CGACATCATTCATCGTAAAGTGG	*Treh1B* 片段扩增
Treh1B-R	AACCGAACCCATCTTGAACG	Amplification of *Treh1B* fragment
Treh2-F	AAATGTGGTGTTTGCTCGGTG	*Treh2* 片段扩增
Treh2-R	CATTTTCGCTGCTCGCTCAT	Amplification of *Treh2* fragment
Sq-Treh1A-F	TAGCGGAACAATGGAGGAGTAAC	*Treh1A* 半定量 RT-PCR
Sq-Treh1A-R	TGTCGGAATACCACCAGGATAGT	Semi-quantitative RT-PCR of *Treh1A*
Sq-Treh1B-F	GGAACTAATCAAGAAGTCTGGTGG	*Treh1B* 半定量 RT-PCR
Sq-Treh1B-R	TCTCTACGACATCGGTGCTGAC	Semi-quantitative RT-PCR of *Treh1B*
Sq-Treh2-F	GAGGATGTCGGAGTATGGCTG	*Treh2* 半定量 RT-PCR
Sq-Treh2-R	CATTCGGATAGTCCCACTGTTC	Semi-quantitative RT-PCR of *Treh2*
Sq-actin-F	CCAAAGGCCAACAGAGAGAAGA	内参基因半定量 RT-PCR
Sq-actin-R	CAAGAATGAGGGCTGGAAGAGA	Semi-quantitative RT-PCR of the reference gene
Realtime-Treh1A-F	CGTAGCGGAACAATGGAGGAG	*Treh1A* 实时定量 PCR
Realtime-Treh1A-R	TGCGTGCTTCTTGAGGAATCTT	qPCR of *Treh1A*
Realtime-Treh1B-F	TTACGAAGATTACACGACCTCACG	*Treh1B* 实时定量 PCR
Realtime-Treh1B-R	ATTACCTACCGATTCATTGCCG	qPCR of *Treh1B*
Realtime-Treh2-F	TGGAGATGATGAACAGGACGG	*Treh2* 实时定量 PCR
Realtime-Treh2-R	TCTGATGCCCACTGATGAAACA	qPCR of *Treh2*
Realtime-actin-F	ACCAACTGGGACGACATGGAGAAA	实时定量 PCR 内参基因
Realtime-actin-R	TCTCTCTGTTGGCCTTTGGGTTGA	qPCR of the reference gene

1.4　海藻糖酶基因序列分析及系统发育树的构建

对获得的序列进行开放阅读框搜索（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html）；利用在线网站进行等电点（isoelectric point，pI）、分子质量（molecular weight，MW）、氨基酸组成和理化性质预测（http://web.expasy.org/protparam/）；信号肽和跨膜区预测分别利用 SignalP 4.1 Server（http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/）与 TMHMM Server v. 2.0（http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/）；Clustal X 软件比对后用 Boxshade（http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html）处理结果；MEGA 5.0.5 软件生成系统发育树（neighbor-joining，NJ 法）。

1.5　海藻糖酶基因的组织特异性的半定量 RT-PCR 分析

以 1.1 节收集滞育蛹和发育蛹（长光照处理 35 d）两个不同时期柞蚕蛹样品为材料，解剖获得各组织后提取 RNA 并合成 cDNA 后进行 PCR 扩增（3 个生物学重复），柞蚕 *β-actin* 为内参基因。PCR 反应体系（25 μL）：cDNA 模板 1 μL，上下游引物（10 μmol/L）各 1 μL，2 × Taq MasterMix 12.5 μL，补充水至总体系 25 μL。PCR 反应程序：94℃ 预变性 3 min；94℃ 变性 30 s，55℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 15 s，28 个循环；72℃ 延伸 10 min。1.2% 琼脂糖凝胶泳检测，结果一致的情况下，选取其中的一个样品作为展示结果。

1.6　柞蚕滞育及非滞育蛹的海藻糖酶基因的 qRCR 检测

以 1.1 节长光照处理滞育蛹和非滞育蛹为材料，每 7 d 收集柞蚕蛹脂肪体组织（3 个生物学重复）提取 RNA 并逆转录成 cDNA，对海藻糖酶基因表达量进行 qPCR 分析（技术重复 3 次），*β-actin* 为

内参基因。参照 SYBR Premix Ex Taq™使用说明书配制反应体系及程序设置。

1.7 柞蚕脂肪体组织海藻糖酶活力检测及血淋巴海藻糖含量变化

1.7.1 海藻糖酶活力测定：以 1.1 节长光照处理滞育蛹为材料，每 7 d 收集柞蚕蛹脂肪体(3 个生物学重复)，利用 3,5-二硝基水杨酸法测定海藻糖酶活力。海藻糖酶能够催化海藻糖产生还原糖，还原糖与 3,5-二硝基水杨酸共热生成棕红色的氨基化合物，这种化合物在 550 nm 紫外光下有特征吸收峰。酶活力测定时的蛋白质定量利用考马斯亮蓝比色法(Bradford, 1976)进行测定。酶活力单位表示为每 mg 组织蛋白每分钟催化产生 1 μg 葡萄糖定义为一个酶活力单位(U)。

1.7.2 海藻糖含量测定：以 1.1 节长光照处理滞育蛹为材料，每 7 d 收集柞蚕蛹血淋巴(3 个生物学重复)，利用蒽酮比色法测定海藻糖含量。血淋巴中海藻糖与蒽酮试剂共热，生成的有色化合物在 620 nm 下有特征吸收峰。

1.8 数据统计与分析

qRCR 数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行数据处理，SPSS 18.0 软件统计分析，单因素 ANOVA 方差分析 Duncan 氏法对数据进行处理；酶活力及海藻糖含量经 Duncan 氏法进行显著性分析，GraphPad Prism 6 作图。

2 结果

2.1 柞蚕海藻糖酶基因的克隆与序列特征

以 Treh1A-F/R, Treh1B-F/R 和 Treh2-F/R 为引物(表 1)克隆得到柞蚕 3 个海藻糖酶基因，经 BlastP 比对，显示与家蚕 Treh 基因(GenBank 登录号：BAA13042.1)和亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* TrehS 基因(GenBank 登录号：ANY30160.1)核苷酸序列一致性分别为 62.54% 和 58.43%；与金凤蝶 *Papilio machaon* Treh 基因(GenBank 登录号：KPJ08342.1)和黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* Treh1B 基因核苷酸序列一致性分别为 65.12% 和 55.56%；与甜菜夜蛾 *Spodoptera exigua* Treh2 基因(GenBank 登录号：ABU95354.1)和棉铃虫 *Helicoverpa armigera* TrehM 基因(GenBank 登录号：AJK29980.1)核苷酸序列一致性分别为 78.33% 和 77.12%。根据比对结果将这 3 个基因分别命名为 *ApTreh1A*, *ApTreh1B* 和 *ApTreh2*(GenBank 登录号分别为：KU977455, KU977456 和 KU977457)。*ApTreh1A* 的 ORF 全长为 1 797 bp，编码 598 个氨基酸，预测的蛋白质分子质量 68.75 kD，等电点为 4.98，具有 15 个氨基酸的信号肽序列，无跨膜区；*ApTreh1B* 的 ORF 全长为 1 635 bp，编码 544 个氨基酸，预测的蛋白质分子质量 62.35 kD，等电点为 5.68，具有 21 个氨基酸的信号肽序列，无跨膜区；*ApTreh2* 的 ORF 全长为1 932 bp，编码 643 个氨基酸，预测的蛋白分子质量 74.00 kD，等电点为 5.82，具有 15 个氨基酸的信号肽序列，有一段约 23 个氨基酸的跨膜区，同时 3 个蛋白都具有 2 个 Treh 特有的标签“QWDyPNaWPP”和“PGGRFrEfYYWDsy”(图 1，下划线)和一个甘氨酸富集区“GGGGEY”(图 1，波浪线)。

2.2 ApTreh 的序列同源性比对及系统进化关系

2.2.1 序列同源性比对：将推测的柞蚕海藻糖酶 ApTreh1A (GenBank 登录号：ARD05073.1)、ApTreh1B (GenBank 登录号：ARD05074.1)、ApTreh2(GenBank 登录号：ARD05075.1)与斜纹夜蛾 *Spodaptera litura* SlTreh1 (GenBank 登录号：ADA63846.1)、SlTreh2 (GenBank 登录号：ADA63845.1)进行氨基酸序列比对分析(图 1)，结果表明 ApTreh1A 和 ApTreh1B 与 SlTreh1 的氨基酸序列一致性分别为 58% 和 49%，而 ApTreh2 与 SlTreh2 的氨基酸序列一致性为 80%，ApTreh1A 与 ApTreh1B 之间的氨基酸序列一致性为 51%。

2.2.2 系统进化关系：从 NCBI 上选取已知昆虫的可溶型海藻糖酶(TrehS)氨基酸序列和膜结合型海藻糖酶(TrehM)氨基酸序列，以大肠杆菌 Treh 序列作为外群构建系统进化树。ApTreh2 与其他昆虫膜结合型海藻糖酶一起构成一个分支，与菜青虫 *Pieris rapae*、斜纹夜蛾、棉铃虫等鳞翅目昆虫的 TrehM 亲缘关系较近，且区别于膜翅目、鞘翅目和半翅目 TrehM 类别组成一个小的分支。柞蚕两类不同类型的可溶型海藻糖酶 Treh1A 和 ApTreh1B 与其他鳞翅目昆虫 TrehS 相似性较高，与鞘翅目两个 TrehS 聚在同一个分支，半翅目、膜翅目和直翅目的昆虫 TrehS 聚类在膜结合型的另一个分支(图 2)。

2.3 *ApTreh* 在蛹滞育期和发育时期的组织表达谱

半定量 RT-PCR 检测柞蚕蛹各组织中 *ApTreh* 的表达量变化，以滞育期和发育时期(35 d)做对比，结果显示，*ApTreh1A* 和 *ApTreh1B* 的表达模式类似，在中肠和脂肪体中，两基因在滞育期的表达量高于发育期，而其他多数组织中的表达量则表现为发育期高于滞育期。*ApTreh2* 的表达量相对 *ApTreh1* 高且表

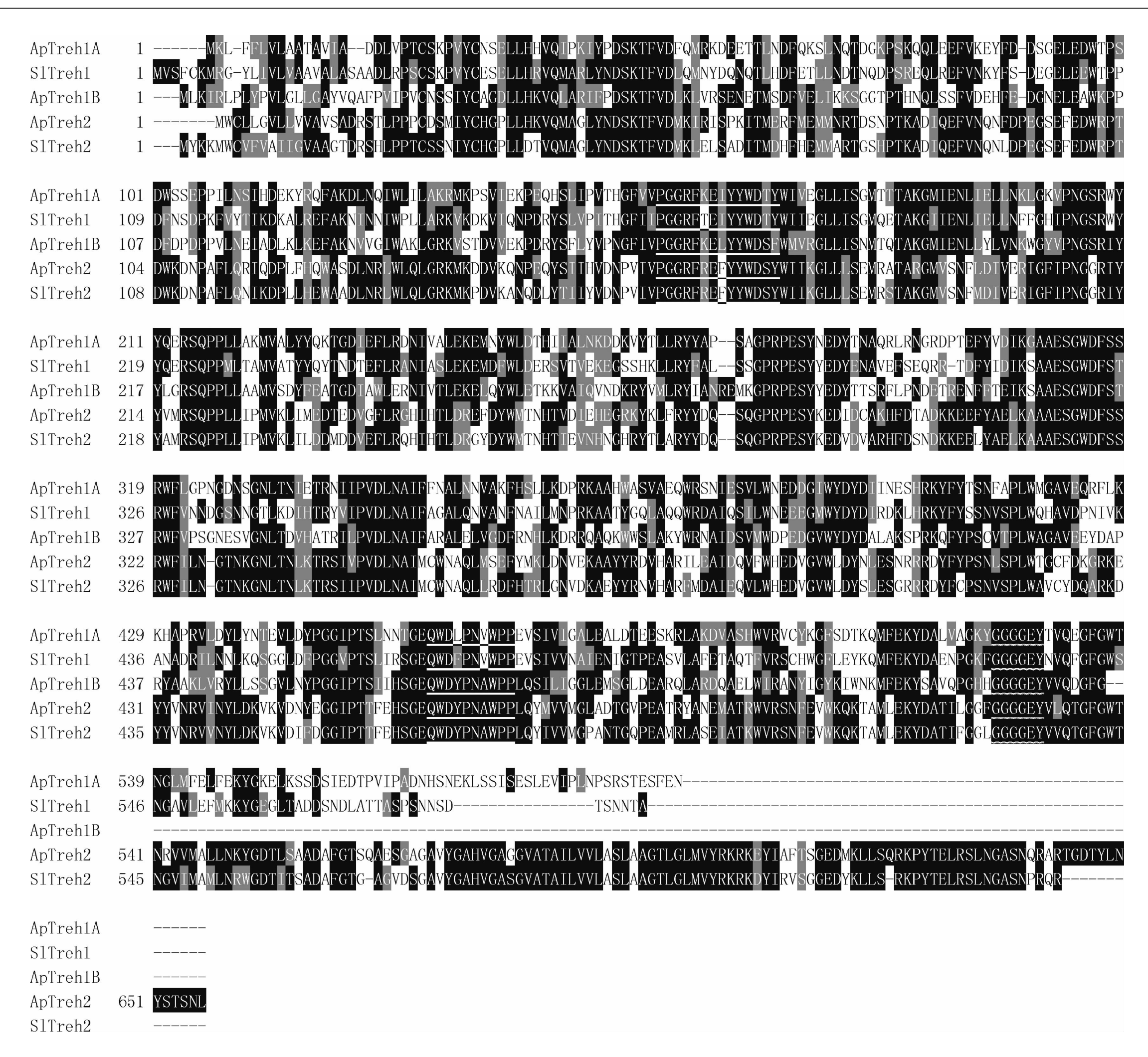


图 1　柞蚕与斜纹夜蛾 Treh 蛋白的氨基酸序列比对

Fig. 1　Multiple alignment of amino acid sequences of Treh proteins from *Antheraea pernyi* and *Spodoptera litura*

Treh 序列来源及 GenBank 登录号 Origin of Treh proteins and their GenBank accession numbers：ApTreh1A（ARD05073.1），ApTreh1B（ARD05074.1），ApTreh2（ARD05075.1）：柞蚕 *Antheraea pernyi*；SlTreh1（ADA63846.1），SlTreh2（ADA63845.1）：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura*. Treh 特有的标签"QWDyPNaWPP"和"PGGRFrEfYYWDsy"用下划线表示，甘氨酸富集区"GGGGEY"用波浪线表示。Typical peptide sequence tags "QWDyPNaWPP" and "PGGRFrEfYYWDsy" in Treh are underlined, and glycine enrichment area "GGGGEY" is underlined with wavy line.

达模式有所不同，只有中肠组织中的表达量表现出在滞育期高于发育期，脂肪体和其他组织（血淋巴、体壁）中的表达量则表现为发育期高于滞育期，或两个时期的表达量相同（如精巢/卵巢和脑）（图 3）。

2.4　滞育解除过程中柞蚕蛹脂肪体 *ApTreh* 的表达变化

qPCR 检测结果表明，柞蚕滞育蛹在长光照（17L∶7D）条件下，*ApTreh1A* 和 *ApTreh1B* 表达模式基本一致，对照组（12L∶12D）的两个基因也表现出类似的表达模式。但 *ApTreh1B* 在长光照条件下的表达量相对于对照组略高，在 21 d 时表达量快速上升到最高点，约为对照组的 4.7 倍。*ApTreh1A* 的表达量在 21 d 时也达到了最高，约为对照组的 2 倍。之后两个基因的表达量都快速下降，35 d 时降到最低，42 d 时小幅上升，但并不显著。对照组在 35 d 时表达量达到最高，之后呈现下降趋势（图 4：A，B）；*ApTreh2* 在滞育期表达量较低，随着滞育的解除表达量逐渐升高，28 d 时达到最高，约为对照组的 2.7 倍，后期逐渐降低，35 d 时降到最低，42 d 时其表达量再次升高，约为对照组的 2.3 倍，对照组表达量逐渐升高，在 35 d 时达到最高，之后有所下降（图 4：C）。

2.5　滞育解除过程中柞蚕蛹脂肪体中海藻糖酶活力和血淋巴中海藻糖含量的变化

柞蚕蛹在滞育解除过程中，长光照组（17L∶7D）脂肪体中海藻糖酶活力前期逐渐升高，21 d 时达到

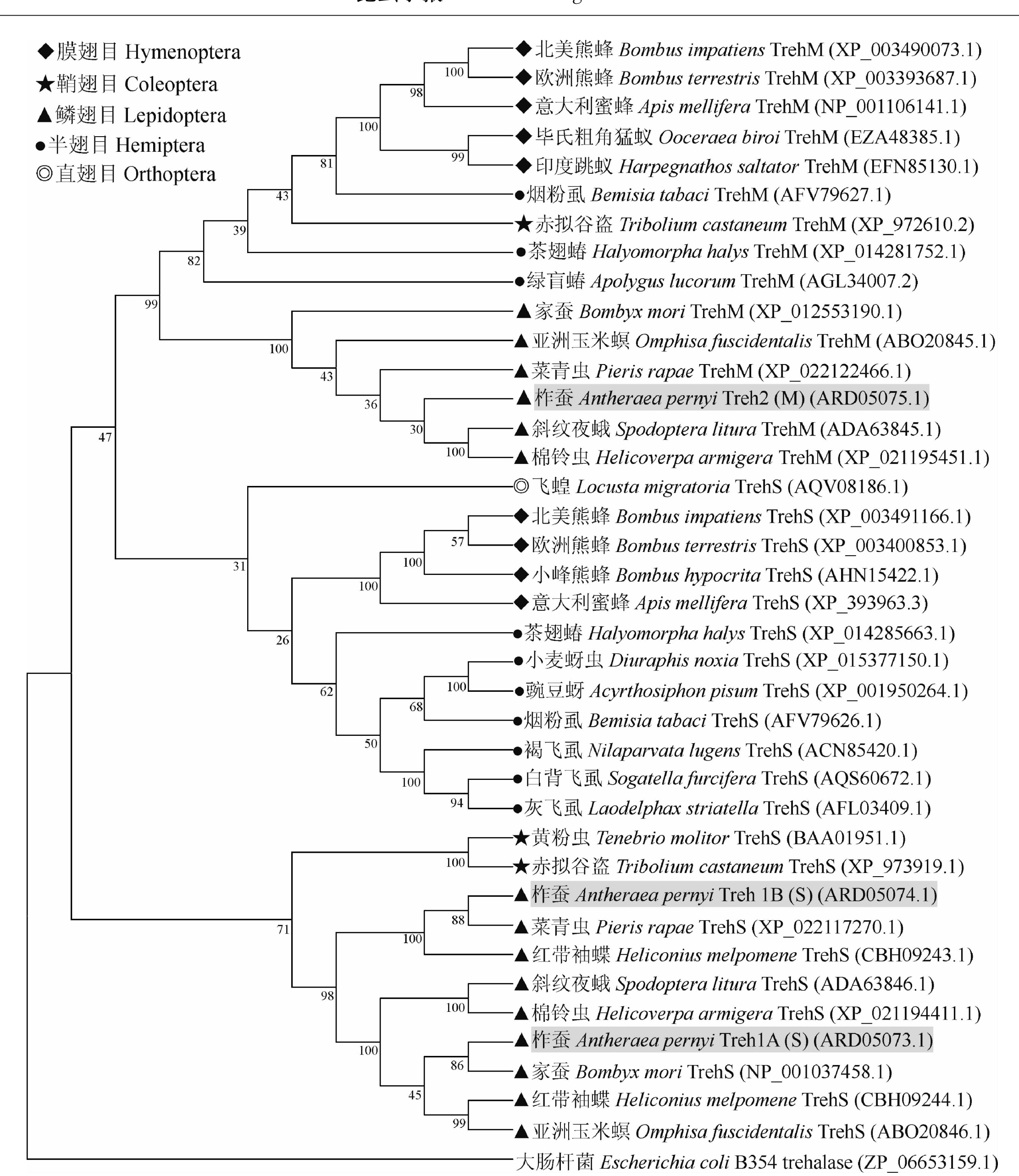


图 2 基于柞蚕和其他物种海藻糖酶氨基酸序列的系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on amino acid sequences of trehalases from *Antheraea pernyi* and other species

进化树分支置信度检测利用 Bootstrap 进行(1 000 次),分支上的数值表示置信度。The topology was tested using bootstrap analysis (1 000 replicates). Numbers at nodes are bootstrap *P*-values.

最高(约 18.5 U),之后逐渐下降,35 d 时降到最低(约 11.2 U),42 d 时酶活力再次小幅回升;对照组(12L:12D)在前 21 d 较为平稳,28 d 时有所降低,但在 35 d 时出现了大幅度的升高,与长光照组趋势相反,后期又有所下降(图 5: A)。长光照组柞蚕蛹血淋巴中海藻糖含量前 7 d 内呈现下降趋势,之后快速升高,21 d 达到最高,小幅下降后在一段时间维持稳定,羽化出蛾前(49 d)海藻糖含量略微升高;对照组中,海藻糖含量整体低于长光照组,并呈现 14 d 内下降,后缓慢升高并趋于稳定的趋势(图 5: B)。

3 讨论

海藻糖是昆虫重要的储能物质和应激代谢产物之一,海藻糖酶能够分解海藻糖,其基因的表达与活性的变化影响昆虫蜕皮、变态、发育及繁殖等生命过程(唐斌等, 2012)。海藻糖酶是滞育激素调控代谢

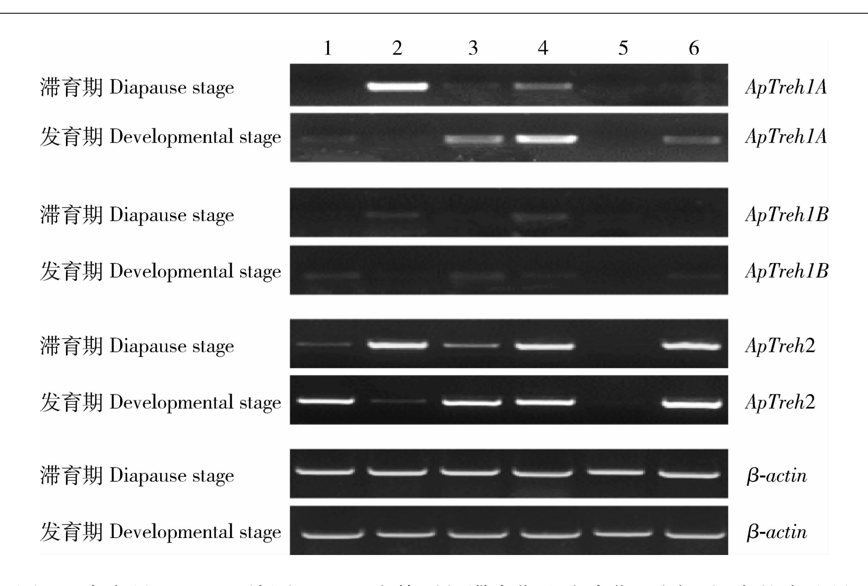


图 3　半定量 RT-PCR 检测 *ApTreh* 在柞蚕蛹滞育期和发育期不同组织中的表达量

Fig. 3　Expression profiles of *ApTreh* in different tissues of diapause stage and developmental stage of *Antheraea pernyi* pupae assayed by semi-quantitative RT-PCR

1：血淋巴 Haemolymph；2：中肠 Midgut；3：体壁 Integument；4：精巢/卵巢 Spermaries/ovaries；5：脂肪体 Fat body；6：脑 Brain. 发育期样品选择羽化前 1 周长光照(17L∶7D)处理35 d 各组织。Tissues were chosen from pupae exposed to long photoperiod (17L∶7D) for 35 d by one week before eclosion.

过程中的关键酶(徐卫华，1992)，20 世纪 80 年代尝试该酶的分离和基因克隆，通过肽段序列和保守序列扩增未能得到该基因，后采用 cDNA 文库构建才明确家蚕海藻糖酶基因序列长 3 103 bp，编码 579 个氨基酸，应为后期分类的可溶型海藻糖酶(Su *et al.*，1993)。

不同组织器官内基因的表达与功能密切相关。有研究表明 TrehS 主要存在于昆虫的消化道和血淋巴中，而 TrehM 主要存在于飞行肌、卵巢等组织(Becker *et al.*，1996)。在大豆蚜 *Aphis glycines*、草地贪夜蛾 *Spodoptera frugiperda* 等昆虫幼虫中检测到 TrehS 主要在中肠和马氏管中表达(Silva *et al.*，2009；Bansal *et al.*，2013)。飞蝗若虫和成虫中 TrehS 主要在体壁、脂肪体和肌肉等组织中表达(刘晓健等，2012)。稻纵卷叶螟 *Cnaphalocrocis medinalis* 中 Treh 在幼虫期稳定表达，在成虫期表达水平较高，蛹期表达水平最低，其中 TrehM 主要分布于成虫肌肉和中肠中(田宇等，2016)。本研究主要检测了 Treh 在柞蚕蛹不同组织中的表达情况，多数组织表现为发育期高于滞育期，*ApTreh*2 的表达量相对 *ApTreh*1 要高。已有的研究表明，Treh 具有调控昆虫能量代谢、影响发育、变态和生殖等生理过程(Shukla *et al.*，2015)。据此作者等认为：柞蚕在蛹解除滞育后，发育期的能量需求高于滞育阶段，所以 *Treh* 在多数组织中表现为发育期的表达量高于滞育期；而中肠组织中例外，滞育期内 *Treh* 表达量更高。推测中肠丧失消化功能后，蛹初期还需要对内存物进行转化处理。对家蚕蛹中肠内容物的测定也有类似的结果，化蛹第 9 天内容物迅速减少了 63.01% ~ 66.17%，推测此时正在转化(可能为羽化时期溶茧酶的重要来源)并释放营养物质(张翠红等，2007)。

蛹期中肠、体壁、马氏管、肌肉等组织退化，脂肪组织能够占到蛹重的 70% 以上。本研究利用 qPCR 检测柞蚕蛹脂肪体中的 *Treh* 的表达模式，对柞蚕滞育蛹解除滞育期的 *Treh* 表达谱研究发现，同为 TrehS 基因的 *ApTreh1A* 和 *ApTreh1B* 表达模式基本相同，长光照处理 21 d 时表达量显著升高，而在我们前期的研究中，糖代谢中的己糖激酶(hexotokinase)出现了表达量显著升高的现象(汝玉涛等，2017)，推测此时可能是滞育蛹解除滞育状态的阶段。海藻糖酶将海藻糖分解成葡萄糖，然后在己糖激酶的作用下进入糖酵解产生能量并进行物质转化(Wilson *et al.*，1997)。*ApTreh*2 表达量逐渐升高，长光照处理 28 d 时达到最高，但未出现快速上升的状态，这可能与该基因的保守性有一定关系。3 个基因在长光照处理 42 d 都表现出了表达量升高的现象，此时为蛹羽化成蛾的前 1 周，蛾的形态较为明显，出现了成虫表皮并与蛹皮易于剥离，推测在蛾的形成过程中，这 3 个海藻糖酶除了提供能量外，还

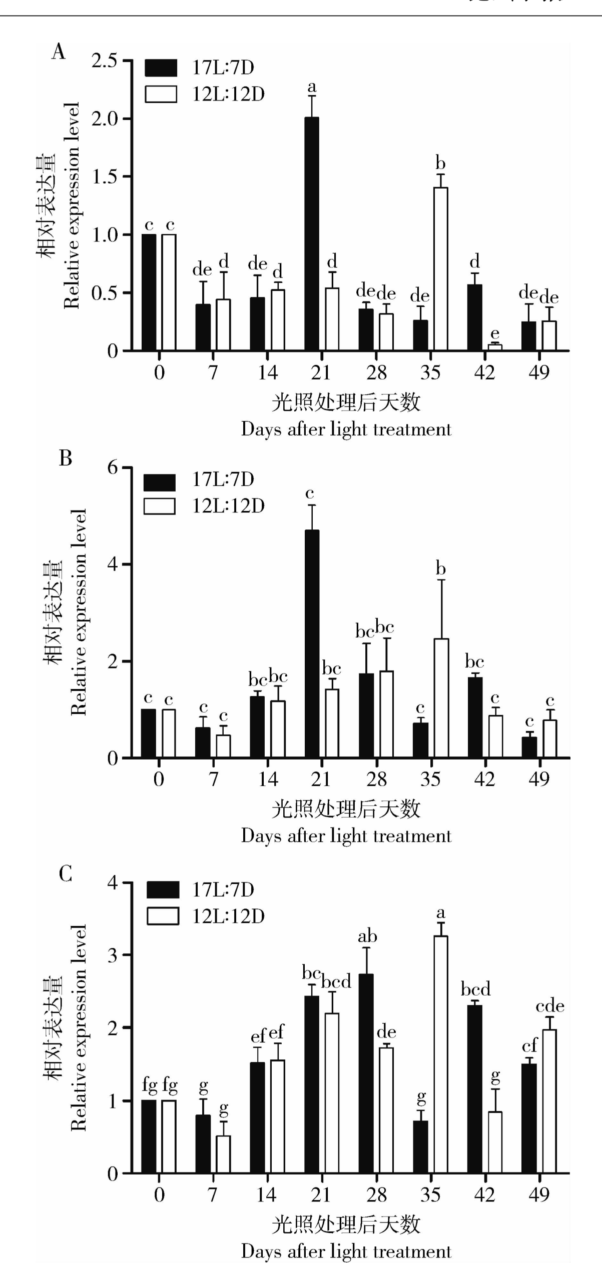


图 4 qPCR 检测滞育解除过程中柞蚕蛹脂肪体中 *ApTreh1A*(A), *ApTreh1B*(B)和 *ApTreh2*(C)的转录变化

Fig. 4 Changes in transcription levels of *ApTreh1A* (A), *ApTreh1B* (B) and *ApTreh2* (C) in fat body of *Antheraea pernyi* pupae during diapause termination detected by qPCR

以光周期 17L: 7D 处理为试验组,以光周期 12L: 12D 处理为对照组,每 7 d 取样,重复 3 次,检测数据以平均值 ± *SE* 表示($n=3$),柱上不同字母表示经 Duncan 氏多重比较后差异显著性($P<0.05$)。Pupae in the experimental group were exposed to long photoperiod (17L: 7D) and those in the control group were exposed to a photoperiod of 12L: 12D and sampled every 7 days. This experiment was conducted in three replicates, the bar represents mean ± *SE*($n=3$), and different letters above bars show significant difference by Duncan's multiple range test ($P<0.05$). 图 5 同 The same for Fig. 5.

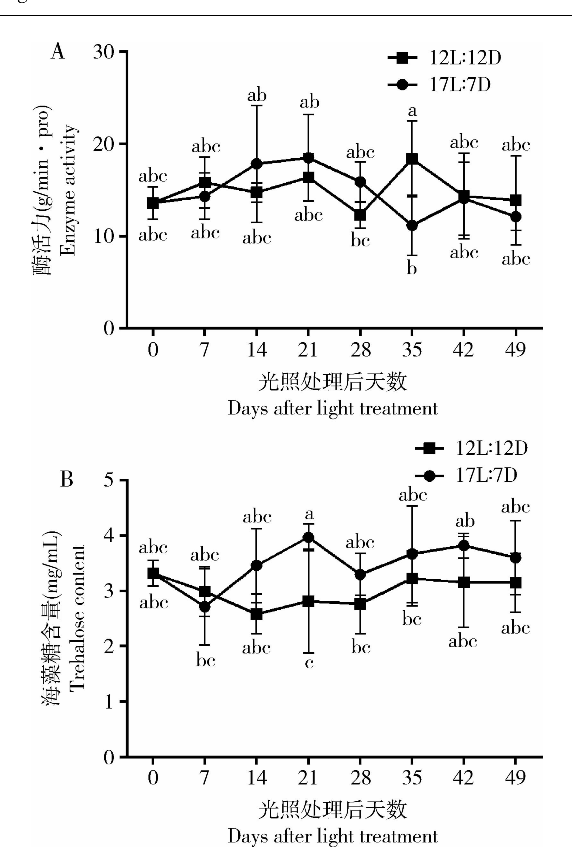


图 5 滞育解除过程中柞蚕蛹脂肪体中海藻糖酶活力(A)和血淋巴中海藻糖含量(B)

Fig. 5 Trehalase activity in fat body (A) and trehalose content in haemolymph (B) of *Antheraea pernyi* pupae during diapause termination

与成虫体壁几丁质的形成密切相关(Chen *et al.*, 2010)。

海藻糖酶活力变化与其基因的表达变化趋势基本一致,长光照处理 21 d 时达到最高,42 d 时酶活力也出现了一个小的升高。糖原转化成海藻糖是帮助昆虫增加血糖浓度,以度过不良环境,糖原磷酸化酶(glycogen phosphorylase, GP)能够使糖原分解成葡萄糖-1-磷酸,进而与二磷酸尿苷葡糖(uridine diphosphate glucose, UDPG)相互作用转化成海藻糖。有研究表明,滞育前后 GP 的活性都低于滞育期(仵均祥等, 2004)。糖原消耗除合成海藻糖以外,还能通过转化成葡萄糖-6-磷酸进入糖酵解或直接合成其他结构性糖类。滞育解除后,昆虫体内不需要大量的海藻糖积累,除了海藻糖分解能够提供能量以外,可能更多地需要糖原直接进入到糖酵解或合成几丁质等物质(成卫宁等, 2009)。从本研究的结果可以看出,柞蚕蛹滞育解除过程中海藻糖酶基因表达的变化与蛹脂肪体中海藻糖酶活性、蛹血淋巴中海藻糖含量的变化趋势呈一致性,海藻糖酶

基因的表达响应可能在柞蚕蛹滞育解除中发挥重要作用。而对于不同类型海藻糖酶在柞蚕体内及发育不同阶段所发挥的作用机制还需要进一步的研究。

参考文献（References）

Bansal R, Mian MA, Mittapalli O, Michel AP, 2013. Molecular characterization and expression analysis of soluble trehalase gene in *Aphis glycines*, a migratory pest of soybean. *Bull. Entomol. Res.*, 103(3): 286 – 295.

Becker A, Schlöder P, Steele JE, Wegener G, 1996. The regulation of trehalose metabolism in insects. *Experientia*, 52(5): 433 – 439.

Bounias M, Bahjou A, Gordoux L, Moreau R, 1993. Molecular activation of a trehalase purified from the fat body of a coleopteran insect (*Tenebrio molitor*), by an endogenous insulin-like peptide. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 31(2): 249 – 266.

Bradford M, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72(1 – 2): 248 – 254.

Chen J, Tang B, Chen H, Yao Q, Huang XF, Chen J, Zhang DW, Zhang WQ, 2010. Different functions of the insect soluble and membrane-bound trehalase genes in chitin biosynthesis revealed by RNA interference. *PLoS ONE*, 5(4): e10133.

Cheng WN, Li XL, Li YP, Li JJ, Wu JX, 2009. Activities of four sugar metabolic enzymes in *Sitodipotsis mosellana* (Gehin) (Diptera: Cecidomyiidae) larvae at different diapause stages. *Acta Entomol. Sin.*, 52(2): 133 – 139. [成卫宁, 李修炼, 李怡萍, 李建军, 仵均祥, 2009. 麦红吸浆虫不同滞育期四种糖代谢酶活力分析. 昆虫学报, 52(2): 133 – 139]

Deng HS, 1980. The effect of sensitization and diapause on pupa silkworms. *Acta Sericol. Sin.*, 6(2): 125 – 128. [邓华山, 1980. 关于柞蚕蛹期感光解除滞育的效应. 蚕业科学, 6(2): 125 – 128]

Ding HM, Ma G, Wu SA, Zhao F, Ma CS, 2011. A literature review on changes of small molecules of diapause insects during overwintering period. *Chin. J. Appl. Entomol.*, 48(4): 1060 – 1070. [丁惠梅, 马罡, 武三安, 赵飞, 马春森, 2011. 滞育昆虫小分子含量变化研究进展. 应用昆虫学报, 48(4): 1060 – 1070]

Huang L, Sun LZ, Wang Y, Ru YT, Irfan M, Jiang YR, Shi SL, Yang RS, Li XS, Qin L, 2016. Changes in the expression of trehalose-6-phosphate synthase gene in *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) during pupal diapause termination. *Acta Entomol. Sin.*, 59(9): 938 – 947. [黄伶, 孙良振, 王勇, 汝玉涛, Irfan M, 姜义仁, 石生林, 杨瑞生, 李喜升, 秦利, 2016. 柞蚕蛹解除滞育过程中海藻糖合成酶基因的表达变化. 昆虫学报, 59(9): 938 – 947]

Li HJ, 2016. Gene Cloning and Expression Analysis of *PTTH* in *Antheraea pernyi*. MSc Thesis, Shenyang Agricultural University, Shenyang. [李慧君, 2016. 柞蚕 *PTTH* 基因的克隆及表达分析. 沈阳: 沈阳农业大学硕士学位论文]

Li XS, Wang GB, Sun Y, Liu W, He YZ, Wang FC, Jiang YR, Qin L, 2016. Transcriptome analysis of the midgut of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi* infected with *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrovirus. *PLoS ONE*, 11(11): e0165959.

Liu XJ, Zhang HH, Li DQ, Cui M, Ma EB, Zhang JZ, 2012. Sequence characterization and mRNA expression profiling of a soluble trehalase gene in *Locusta migratoria* (Orthoptera: Acrididae). *Acta Entomol. Sin.*, 55(11): 1264 – 1271. [刘晓健, 张欢欢, 李大琪, 崔淼, 马恩波, 张建珍, 2012. 飞蝗可溶型海藻糖酶基因的序列分析及 mRNA 表达特性. 昆虫学报, 55(11): 1264 – 1271]

Lu MX, Yang CS, 1992. Dynamic temperature and photoperiodic effects of carbohydrate content in the fat body and haemolymph of the *Antheraea pernyi* (Lepidoptera: Saturniidae) pupae. *Acta Entomol. Sin.*, 35 (1): 1 – 7. [陆明贤, 杨长松, 1992. 柞蚕蛹脂肪体和血淋巴中糖类含量动态的温度和光周期效应. 昆虫学报, 35 (1): 1 – 7]

Mitsumasu K, Azuma M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2005. Membrane-penetrating trehalase from silkworm *Bombyx mori*. Molecular cloning and localization in larval midgut. *Insect Mol. Biol.*, 14(5): 501 – 508.

Qin L, Li SY, 2017. Chinese Tussah. China Agriculture Press, Beijing. 130 – 132. [秦利, 李树英, 2017. 中国柞蚕学. 北京: 中国农业出版社. 130 – 132]

Ru YT, Wang Y, Wang DY, Zhou JL, Zeng J, Zhu XW, Jiang YR, Qin L, 2017. Tissue-specific expression and enzyme activity variations of *Antheraea pernyi* hexokinase genes during diapause termination and pupa development. *Acta Sericol. Sin.*, 43(5): 773 – 781. [汝玉涛, 王勇, 王德意, 周敬林, 曾军, 朱绪伟, 姜义仁, 秦利, 2017. 柞蚕己糖激酶基因的组织表达特征及在解除滞育和蛹发育期的表达与酶活性变化. 蚕业科学, 43(5): 773 – 781]

Sauman I, Reppert SM, 1996. Molecular characterization of prothoracicotropic hormone (PTTH) from the giant silkmoth *Antheraea pernyi*: developmental appearance of PTTH-expressing cells and relationship to circadian clock cells in central brain. *Dev. Biol.*, 178(2): 418 – 429.

Shukla E, Thorat LJ, Nath BB, Gaikwad SM, 2015. Insect trehalase: physiological significance and potential applications. *Glycobiology*, 25(4): 357 – 367.

Silva MC, Ribeiro AF, Terra WR, Ferreira C, 2009. Sequencing of *Spodoptera frugiperda* midgut trehalases and demonstration of secretion of soluble trehalase by midgut columnar cells. *Insect Mol. Biol.*, 18(6): 769 – 784.

Su ZH, Sato Y, Yamashita O, 1993. Purification, cDNA cloning and Northern blot analysis of trehalase of pupal midgut of the silkworm, *Bombyx mori*. *BBA – Gene Struct. Expr.*, 1173(2): 217 – 224.

Takiguchi MU, Niimi T, Su ZH, Yaginuma T, 1992. Trehalase from male accessory gland of an insect, *Tenebrio molitor*. cDNA sequencing and developmental profile of the gene expression. *Biochem. J.*, 288(1): 19 – 22.

Tang B, Wei P, Chen J, Wang SG, Zhang WQ, 2012. Progress in gene features and functions of insect trehalases. *Acta Entomol. Sin.*, 55 (11): 1315 – 1321. [唐斌, 魏苹, 陈洁, 王世贵, 张文庆, 2012. 昆虫海藻糖酶的基因特性及功能研究进展. 昆虫学报,

55(11): 1315 – 1321]

Thompson SN, 2003. Trehalose – the insect 'blood' sugar. *Adv. Insect Physiol.*, 31(3): 205 – 285.

Tian Y, Du J, Li SW, Li J, Wang S, 2016. Molecular cloning, characterization and expression analysis of trehalase genes in the rice leaf folder, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Acta Entomol. Sin.*, 59(6): 602 – 612. [田宇, 杜娟, 李尚伟, 李娇, 王爽, 2016. 稻纵卷叶螟海藻糖酶基因的克隆、分子特性和表达分析. 昆虫学报, 59(6): 602 – 612]

Wang MQ, Li ZZ, 2004. The research advance of insect diapause. *J. Nanjing For. Univ.* (*Nat. Sci. Ed.*), 28(1): 71 – 76. [王满囷, 李周直, 2004. 昆虫滞育的研究进展. 南京林业大学学报(自然科学版), 28(1): 71 – 76]

Wilson JE, 1997. An introduction to the isoenzymes of mammalian hexokinase types I – III. *Biochem. Soc. Trans.*, 25(1): 103 – 107.

Wu JX, Yuan F, Su L, 2004. Change of carbohydrate contents in larvae of the wheat midge, *Sitodiplosis mosellana* (Gehin) during mature and diapause stage. *Acta Entomol. Sin.*, 47(2): 178 – 183. [仵均祥, 袁锋, 苏丽, 2004. 麦红吸浆虫幼虫滞育期间糖类物质变化. 昆虫学报, 47(2): 178 – 183]

Xu WH, 1992. Progress in insect diapause research. *Entomol. Knowl.*, 45(4): 512 – 517. [徐卫华, 1992. 昆虫滞育研究进展. 昆虫知识, 45(4): 512 – 517]

Yamashita O, 1996. Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function. *J. Insect Physiol.*, 42(7): 669 – 679.

Zhang CH, Cui WZ, Guo YK, Wang YW, Mu ZM, 2007. Ultrastructure changes and function of the midgut and salivary glands in *Bombyx mori* during the pupal-adult metamorphism. *Acta Entomol. Sin.*, 50(8): 769 – 774. [张翠红, 崔为正, 郭延奎, 王彦文, 牟志美, 2007. 家蚕蛹-成虫变态期中肠和涎腺超微结构变化与功能. 昆虫学报, 50(8): 769 – 774]

Zhang Q, Lu DH, Pu J, Wu M, Han ZJ, 2012. Cloning and RNA interference effects of trehalase genes in *Laodelphax striatellus* (Homoptera: Delphacidae). *Acta Entomol. Sin.*, 55(8): 911 – 920. [张倩, 鲁鼎浩, 蒲建, 吴敏, 韩召军, 2012. 灰飞虱海藻糖酶基因的克隆及 RNA 干扰效应. 昆虫学报, 55(8): 911 – 920]

Zhao LN, Yang MM, Shen QD, Liu XJ, Shi ZK, Wang SG, Tang B, 2016. Functional characterization of three trehalase genes regulating the chitin metabolism pathway in rice brown planthopper using RNA interference. *Sci. Rep.*, 6: 27841.

(责任编辑: 马丽萍)